

学位論文（テーシス）要旨

乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の細胞遺伝学的解析 —劣化した DNA の高密度一塩基多型マイクロアレイへの適用—

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 及川 将弘
(主任指導教員： 永安 武 教授)

【目的】

乳腺の嚢胞内乳頭状腫瘍には良性の乳頭腫、悪性の上皮内乳頭癌、浸潤性乳頭癌が含まれ、術前の画像所見や病理所見によっても良悪性の鑑別が困難である。また、本病変についての細胞遺伝学的研究は少ない。

本研究の目的は、未だ不明な点の多い乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍についての細胞遺伝学的プロファイルを、高密度一塩基多型 (SNP) マイクロアレイを用いた競合ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) という新しい技術によって明らかにすることにある。本研究により、臨床的に良悪性の判断の難しいこの疾患について、新たな診断手技開発の端緒となると考えた。また、良性から悪性への進展に関わるメカニズムの解明にも貢献すると考えた。目的を達成するためには、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本から抽出した劣化した DNA を高密度 SNP マイクロアレイに適用するという技術的なハードルを越えなければならなかった。

【対象と方法】

- ① 劣化した DNA の SNP マイクロアレイへの適用を検討するため、爪から抽出した DNA を用いた家族性脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) 家系のゲノムワイド連鎖解析を行った。
- ② 5 例の良性乳頭腫 (Pap 群)、3 例の上皮内乳頭癌 (purePC 群)、2 例の浸潤を伴う乳頭癌 (PCinv 群) を含む 10 例の嚢胞内乳頭状腫瘍について、FFPE 標本の腫瘍部と正常部から DNA を抽出し、SNP マイクロアレイを用いたアレイ CGH を行った。

【結 果】

- ① GeneChip の実験の質を示す指標である QC call rate は 96.05% から 80.07%、平均 91.79% であった。ゲノムワイド連鎖解析の結果、5p13.2-q14.1, 15q11.2-q13.1, 18p11.32-14.1 の 3 箇所を疾患原因候補領域として同定した。これらの領域におけるマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析の結果は、SNP マイクロアレイを用いたハプロタイプ解析の結果と一致した。
- ② 得られた QC call rate は、70.8% から 91.9%、平均で 80.7% であった。ゲノム全体における染色体構造変化を示した領域の割合は、Pap 群で 2.87%、purePC 群で平均

15.4%、PCinv 群で 35.3%であった。悪性(PurePC 群+PCinv 群)は統計学的有意差をもって、良性(Pap 群)より多くの染色体構造変化を有し (P=0.016)、良性腫瘍から上皮内癌、浸潤癌と進行するにつれて多くの染色体構造変化を獲得していた (P=0.043)。悪性群のなかで最も高頻度 (≥80%) に共有されている染色体構造変化は 3p21.31 と 3p14.2 のコピー数が正常な loss of heterozygosity (LOH) と 20q13.13 の増幅であった。

【考 察】

爪から抽出した DNA を SNP マイクロアレイに適用したが、プロトコルの工夫により得られた call rate は満足のものであった。爪から抽出した断片化 DNA を使用しても SNP マイクロアレイでの解析は可能であると考えられた。

劣化した DNA の SNP マイクロアレイ使用が可能であったので、本研究の最大の目的である乳腺嚢胞内乳頭状病変解析を FFPE 標本から抽出した DNA を用いて行った。得られた QC call rate は高品質な DNA を用いた場合と比べて劣るものであったが、同一 FFPE ブロックの正常部から抽出したゲノム DNA を対照に使うことにより、アレイ CGH の結果のアーチファクトを抑えることが可能であった。今回の研究では、ゲノム不安定性の観点からは、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の乳頭癌はたとえ上皮内癌であったとしても、良性乳頭腫と大きな違いがあることを明らかにした。これにより、術前の生検標本を用いたコピー数・LOH 解析により良悪性の診断を行い、不必要な外科的介入を避けられる可能性が示唆された。さらに、その他の組織型・癌腫についても、マイクロアレイを用いることによりゲノム不安定性を定量的に解析することが可能であり、癌の予後因子・治療効果予測因子として有用であると思われる。また、悪性群の中で最も高頻度に共有されているゲノム構造変化として 3p21.31 と 3p14.2 のコピー数が正常な LOH と 20q13.13 の増幅が明らかになった。これらの生物学的意義については、今後さらなる検討を進めていかなければならない。

〔基礎となった学術論文〕

1. Masahiro Oikawa, Takeshi Nagayasu, Hiroshi Yano, Tomayoshi Hayashi, Kuniko Abe, Akira Kinoshita, Koh-ichiro Yoshiura, **Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism microarrays.** *The Breast Journal* 17(4): 2011, In press
2. Masahiro Oikawa, Hideo Kuniba, Tatsuro Kondoh, Akira Kinoshita, Takeshi Nagayasu, Norio Niikawa, Koh-ichiro Yoshiura, **Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array.** *European Journal of Medical Genetics* 53: 2010, 244-249